

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/006423

International filing date: 25 March 2005 (25.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2005-059057
Filing date: 03 March 2005 (03.03.2005)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 5 年 3 月 3 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 5 - 0 5 9 0 5 7

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

J P 2 0 0 5 - 0 5 9 0 5 7

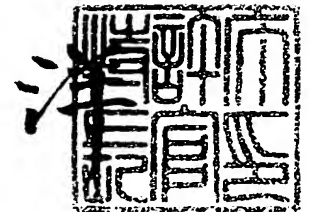
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

出 願 人
Applicant(s): 富士写真フイルム株式会社

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

2 0 0 5 年 4 月 1 3 日

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P052375
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/10
C07H 21/02

【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水3丁目11番46号 富士写真フイルム株式会
社内
【氏名】 猪股 弘子

【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水3丁目11番46号 富士写真フイルム株式会
社内
【氏名】 半戸 里江

【特許出願人】
【識別番号】 000005201
【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代理人】
【識別番号】 100105647
【弁理士】
【氏名又は名称】 小栗 昌平
【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】
【識別番号】 100105474
【弁理士】
【氏名又は名称】 本多 弘徳
【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】
【識別番号】 100108589
【弁理士】
【氏名又は名称】 市川 利光
【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】
【識別番号】 100115107
【弁理士】
【氏名又は名称】 高松 猛
【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】
【識別番号】 100090343
【弁理士】
【氏名又は名称】 濱田 百合子
【電話番号】 03-5561-3990

【先の出願に基づく優先権主張】
【出願番号】 特願2004- 92000
【出願日】 平成16年 3月26日

【先の出願に基づく優先権主張】
【出願番号】 特願2004-225286
【出願日】 平成16年 8月 2日

【先の出願に基づく優先権主張】
【出願番号】 特願2005- 29177
【出願日】 平成17年 2月 4日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 092740

【納付金額】 16,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0003489

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

DNAとRNAを含む核酸混合物溶液を、
少なくとも二個の開口を有する容器内に、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジを用いて、
(a)核酸吸着性多孔性膜に核酸を吸着させる工程、
(b)洗浄液により核酸が吸着した状態で核酸吸着性多孔性膜を洗浄する工程、
(c)核酸吸着性多孔性膜でDNaseを作用させる工程、
(d)洗浄液により核酸吸着性多孔性膜を洗浄する工程、
(e)回収液により核酸吸着性多孔性膜内からRNAを脱着させ、上記カートリッジ外に排出する工程
を含み、核酸分離精製カートリッジの核酸吸着性多孔性膜でDNaseを作用させる工程におけるDNase溶液の全液量が核酸吸着性多孔性膜 1 cm^2 あたり $130\text{ }\mu\text{ l}$ 以下で行うことを特徴とするRNAの選択的分離精製方法。

【請求項 2】

DNase溶液におけるDNase濃度が 10 Kunitz U/mL 以上 10000 Kunitz U/mL 以下である請求項 1 に記載のRNAの選択的分離精製方法。

【請求項 3】

核酸吸着性多孔性膜が、イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着する有機高分子からなる請求項 1 又は 2 に記載のRNAの選択的分離精製方法。

【請求項 4】

核酸吸着性多孔性膜が、水酸基を有する請求項 3 に記載のRNAの選択的分離精製方法。

【請求項 5】

核酸吸着性多孔性膜が、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物を鹸化処理した有機材料からなる請求項 1 ～ 4 の何れかに記載のRNAの選択的分離精製方法。

【請求項 6】

核酸吸着性多孔性膜が、表裏非対称性の膜である請求項 1 ～ 5 の何れかに記載のRNAの選択的分離精製方法。

【請求項 7】

核酸混合物溶液が、検体を核酸可溶化試薬で処理して得られた溶液に水溶性有機溶媒を添加して得られた液である請求項 1 ～ 6 の何れかに記載のRNAの選択的分離精製方法。

【請求項 8】

検体が、培養細胞である請求項 7 に記載のRNAの選択的分離精製方法。

【請求項 9】

培養細胞が、浮遊系細胞である請求項 8 に記載のRNAの選択的分離精製方法。

【請求項 10】

培養細胞が、接着系細胞である請求項 8 に記載のRNAの選択的分離精製方法。

【請求項 11】

検体が、動物組織である請求項 7 に記載のRNAの選択的分離精製方法。

【請求項 12】

核酸可溶化試薬が、カオトロピック塩、核酸安定化剤、界面活性剤、緩衝剤及び消泡剤から選ばれる少なくとも一つを含む請求項 7 ～ 11 の何れかに記載のRNAの選択的分離精製方法。

【請求項 13】

カオトロピック塩が、塩酸グアニジンまたはグアニジンチオシアン酸塩から選ばれる少なくとも一つである請求項 12 に記載のRNAの選択的分離精製方法。

【請求項 14】

水溶性有機溶媒が、メタノール、エタノール、プロパノール及びブタノールから選ばれる少なくとも一つを含む請求項 7 ～ 13 の何れかに記載のRNAの選択的分離精製方法。

【請求項 15】

洗浄液が、メタノール、エタノール、プロパノール及びブタノールから選ばれる少なくとも一つのアルコールを含む溶液であり、該洗浄液が該アルコールを5～100質量%含む請求項1～14の何れかに記載のRNAの選択的分離精製方法。

【請求項 16】

回収液が、その塩濃度が0.5mol/L以下の溶液である請求項1～15の何れかに記載のRNAの選択的分離精製方法。

【請求項 17】

圧力差発生装置が、核酸分離精製カートリッジの一の開口に着脱可能に結合されるポンプである請求項1～16の何れかに記載のRNAの選択的分離精製方法。

【請求項 18】

請求項1～17に記載のRNAの選択的分離精製方法を行うための、核酸分離精製カートリッジと試薬のキット。

【請求項 19】

請求項1～17に記載のRNAの選択的分離精製方法を、自動で行う装置。

【請求項 20】

請求項18に記載のキットの使用を、自動で行う装置。

【書類名】明細書

【発明の名称】RNAの選択的分離精製方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、RNAを選択的分離精製する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

核酸は、様々な分野で種々の形態で使用されている。例えば、組換え核酸技術の領域においては、核酸をプローブ、ゲノム核酸、およびプラスミド核酸の形態で用いることが要求される。

【0003】

診断分野においても、核酸は種々の形態で種々の目的に用いられている。例えば、核酸プローブは、ヒトの病原体の検出および診断に日常的に用いられている。同様に核酸は遺伝障害の検出に用いられている。核酸はまた食品汚染物質の検出にも用いられている。さらに、核酸は遺伝地図の作製からクローニングおよび組換え発現におよぶ種々の目的により、興味ある核酸の位置確認、同定および単離において日常的に用いられている。

【0004】

多くの場合、核酸は極めて少量でしか入手できず、そして単離および精製操作が煩雑で時間を要する。このしばしば時間を消費する煩雑な操作は核酸の損失に結びつきやすい。

血清、尿およびバクテリアのカルチャーから得られた試料から核酸を精製する場合には、コンタミネーションおよび疑陽性の結果が生じるという危険性も加わる。

【0005】

広く知られた分離精製方法の一つに、核酸を二酸化珪素、シリカポリマー、珪酸マグネシウム等の固相に吸着させ、これに引き続いて洗浄、脱着等の操作を行い、分離精製する方法がある（例えば、特許文献1）。この方法は、分離性能として優れているが、簡便性、迅速性、自動化適性において充分といえず、またこの方法に用いられる器具および装置は小型化に不向きであり、さらに器具および装置、特に吸着媒体を同一性能で工業的に大量生産することが困難であり、かつ取扱いが不便で、種々の形状に加工しがたい等の問題点がある。さらに、素材自体が脆いために機械的強度を得るには一定以上の厚みが必要となるため、特にDNAとRNAの混合試料からRNAを選択的に回収するために、DNaseでDNAを分解する際に、DNaseを固相に均一に作用させるには一定量以上の液量が必要となる等の問題がある。DNaseは比較的高価なものであり、今後ますます必要性が増加すると予測されるRNAの選択的回収の際に問題となる。

【0006】

また、簡便かつ効率よく核酸を分離精製する方法の一つとして、固相に核酸を吸着させる溶液及び固相から核酸を脱着させる溶液をそれぞれ用いて、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着及び脱着させることによって、核酸を分離精製する方法が提案されている（特許文献2）が、更なる改良が望まれる。

【0007】

その他に、従来から知られている核酸分離精製法としては、遠心法によるもの、磁気ビーズを用いるもの、フィルターを用いるものなどがある。また、これらを利用した核酸分離精製装置が提案されている。例えば、フィルターを用いた核酸分離精製装置としては、フィルターを収容したフィルターチューブをラックに多数セットし、これに核酸を含む試料溶液を分注し、前記ラックの底部の周囲をシール材を介してエアチャンバーで密閉して内部を減圧し、全フィルターチューブを同時に排出側より吸引し試料液を通過させて核酸をフィルターに吸着し、その後、洗浄液および回収液を分注して、再び減圧吸引して洗浄・脱着するようにした自動装置が提案されている（例えば、特許文献3参照）。

【特許文献1】特公平7-51065号公報

【特許文献2】特開2003-128691号公報

【特許文献3】特許第2832586号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、RNAとDNAを含む核酸混合物から、検体中の核酸を核酸吸着性の多孔性膜に吸着させた後、洗浄等を経て脱着させてRNAを選択的に分離精製する、より安価な方法を提供することである。さらに詳しくは、分離性能に優れ、洗浄効率がよく、簡便で、迅速で、自動化適性に優れ、実質的に同一の分離性能を有するものを大量に生産可能である多孔性膜を使用して、DNAとRNAの混合試料から、RNAを選択的に回収する、より安価で、純度のよい方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、二個の開口を有する容器内に多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジを使用し、RNAとDNAを含む核酸混合物を多孔性膜に吸着及び脱着させる工程を含むRNAの選択的分離精製方法において、該方法が多孔性膜でDNAをDNaseで分解する工程を含み、特に該工程におけるDNaseの液量を核酸吸着性多孔性膜 1 cm^2 当たり $130\text{ }\mu\text{ l}$ 以下で行うことで、上記課題を達成できることを見出し、本発明を完成したものである。即ち、本発明は、下記の構成よりなるものである。

【0010】

1. DNAとRNAを含む核酸混合物溶液を、少なくとも二個の開口を有する容器内に、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジを用いて、

(a) 核酸吸着性多孔性膜に核酸を吸着させる工程、
(b) 洗浄液により核酸が吸着した状態で核酸吸着性多孔性膜を洗浄する工程、
(c) 核酸吸着性多孔性膜でDNaseを作用させる工程、
(d) 洗浄液により核酸吸着性多孔性膜を洗浄する工程、
(e) 回収液により核酸吸着性多孔性膜内からRNAを脱着させ、上記カートリッジ外に排出する工程、
を含み、核酸分離精製カートリッジの核酸吸着性多孔性膜でDNaseを作用させる工程におけるDNase溶液の全液量が核酸吸着性多孔性膜 1 cm^2 あたり $130\text{ }\mu\text{ l}$ 以下で行うことを特徴とするRNAの選択的分離精製方法。

【0011】

2. DNase溶液におけるDNase濃度が 10 Kunitz U/mL 以上 1000 Kunitz U/mL 以下であることを特徴とする第1項に記載のRNAの選択的分離精製方法。

【0012】

3. 核酸吸着性多孔性膜が、イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着する有機高分子からなる第1項又は第2項に記載のRNAの選択的分離精製方法。

【0013】

4. 核酸吸着性多孔性膜が、水酸基を有する第3項に記載のRNAの選択的分離精製方法

【0014】

5. 核酸吸着性多孔性膜が、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物を酸処理した有機材料からなる第1項～第4項の何れかに記載のRNAの選択的分離精製方法。

【0015】

6. 核酸吸着性多孔性膜が、表裏非対称性の膜である第1項～第5項の何れかに記載のRNAの選択的分離精製方法。

【0016】

7. 核酸混合物溶液が、検体を核酸可溶化試薬で処理して得られた溶液に水溶性有機溶媒を添加して得られた液である第1項～第6項の何れかに記載のRNAの選択的分離精製

方法。

【0017】

8. 検体が、培養細胞である、第7項に記載のRNAの選択的分離精製方法。

【0018】

9. 培養細胞が、浮遊系細胞である第8項に記載のRNAの選択的分離精製方法。

【0019】

10. 培養細胞が、接着系細胞である第8項に記載のRNAの選択的分離精製方法。

【0020】

11. 検体が、動物組織である第7項に記載のRNAの選択的分離精製方法。

【0021】

12. 核酸可溶化試薬が、カオトロピック塩、核酸安定化剤、界面活性剤、緩衝剤及び消泡剤から選ばれる少なくとも一つを含む第7項～第11項の何れかに記載のRNAの選択的分離精製方法。

【0022】

13. カオトロピック塩が、塩酸グアニジンまたはグアニジンチオシアン酸塩から選ばれる少なくとも一つである第12項に記載のRNAの選択的分離精製方法。

【0023】

14. 水溶性有機溶媒が、メタノール、エタノール、プロパノール及びブタノールから選ばれる少なくとも一つを含む第7項～第13項の何れかに記載のRNAの選択的分離精製方法。

【0024】

15. 洗浄液が、メタノール、エタノール、プロパノール及びブタノールから選ばれる少なくとも一つのアルコールを含む溶液であり、該洗浄液が該アルコールを5～100質量%含む第1項～第14項の何れかに記載のRNAの選択的分離精製方法。

【0025】

16. 回収液が、その塩濃度が0.5mol/L以下の溶液である第1項～第15項の何れかに記載のRNAの選択的分離精製方法。

【0026】

17. 圧力差発生装置が、核酸分離精製カートリッジの一の開口に着脱可能に結合されるポンプである第1項～第16項の何れかに記載のRNAの選択的分離精製方法。

【0027】

18. 第1項～第17項に記載のRNAの選択的分離精製方法を行うための、核酸分離精製カートリッジと試薬のキット。

【0028】

19. 第1項～第17項に記載のRNAの選択的分離精製方法を、自動で行う装置。

20. 第18項に記載のキットの使用を、自動で行う装置。

【発明の効果】

【0029】

本発明によれば、分離性能に優れ、洗浄効率がよく、簡便で、迅速で、自動化および小型化適性に優れ、実質的に同一の分離性能を有するものを大量に生産可能である多孔性膜を使用して、DNAとRNAの混合試料から、より安価に、純度よくRNAを選択的に精製できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0030】

本発明の核酸分離精製方法は、DNAとRNAを含む核酸混合物溶液を、少なくとも二つの開口を有する容器内に、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジを用いて、

(a) 核酸吸着性多孔性膜に核酸を吸着させる工程（以下、「吸着工程」とも言う。）、

(b) 洗浄液により核酸が吸着した状態で核酸吸着性多孔性膜を洗浄する工程（以下、「洗浄工程1」とも言う。）、

(c) 核酸吸着性多孔性膜でDNAseを作用させる工程、

(d) 洗浄液により核酸吸着性多孔性膜を洗浄する工程（以下、「洗浄工程2」とも言う。）

(e) 回収液により核酸吸着性多孔性膜内からRNAを脱着させ、上記カートリッジ外に排出する工程（以下、「回収工程」とも言う。）

を少なくとも含むものである。

【0031】

好ましくは、上記(a)、(b)、(c)、(d)及び(e)の各工程において、DNAとRNAを含む核酸混合物溶液、洗浄液、DNAse溶液又は回収液を、加圧状態で核酸吸着性多孔性膜に通過させるものであり、より好ましくは、上記(a)、(b)、(c)、(d)及び(e)の各工程において、少なくとも二つの開口を有する容器内に該核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジの二つの開口に、核酸混合物溶液、洗浄液、DNAse溶液又は回収液を注入し、カートリッジの上記二つの開口に結合された圧力差発生装置を用いてカートリッジ内を加圧状態にして、注入した各液を通過させ、他の開口より排出させるものである。DNAとRNAを含む核酸混合物溶液、洗浄液、DNAse溶液又は回収液を加圧状態で上記多孔性膜に通過させることにより、装置をコンパクトに自動化することができ、好ましい。ポンプの加圧は、好ましくは10～300kPa、より好ましくは40～200kPaの程度で行われる。

【0032】

さらに好ましくは、上記核酸吸着性多孔性膜を収容する核酸分離精製カートリッジを用いて、以下の工程でRNAを分離精製することができる。

すなわち、(1) DNAとRNAを含む核酸混合物溶液を、少なくとも二つの開口を有する容器内に、溶液が内部を通過可能な、核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジの二つの開口に注入する工程、(2) 核酸分離精製カートリッジの上記二つの開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入したDNAとRNAを含む核酸混合物溶液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、核酸分離精製カートリッジの他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜内に核酸を吸着させる工程、(3) 核酸分離精製カートリッジの上記二つの開口に洗浄液を注入する工程、(4) 核酸分離精製カートリッジの上記二つの開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した洗浄液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜を、核酸が吸着した状態で、洗浄する工程、(5) 核酸分離精製カートリッジの上記二つの開口にDNAse液を注入し核酸吸着性多孔性膜でDNAseを作用させる工程、(6) 核酸分離精製カートリッジの上記二つの開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入したDNAse液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、他の開口より排出する工程、(7) 核酸分離精製カートリッジの上記二つの開口に洗浄液を注入する工程、(8) 核酸分離精製カートリッジの上記二つの開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した洗浄液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜を、RNAが吸着した状態で、洗浄する工程、(9) 核酸分離精製カートリッジの上記二つの開口に回収液を注入する工程、(10) 核酸分離精製カートリッジの二つの開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した回収液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜内からRNAを脱着させ、核酸分離精製カートリッジ容器外に排出する工程を、挙げることができる。

【0033】

上記のRNA分離精製の工程では、最初の核酸混合物溶液を注入から核酸分離精製カートリッジ外にRNAを得るまでの工程を実質20分以内、好適な状況では2分以内で終了することが可能である。

【0034】

また、上記のRNA分離精製の工程では、紫外可視分光光度計での測定値（260nm／280nm）が、1.8～2.2となる純度を持つRNAを回収することができ、不純物混入量の少ない高純度のRNAを定常的に得ることができる。好適な状況では、紫外可視分光光度計での測定値（260nm／280nm）が2.0付近となる純度を持つRNAを回収することができる。

【0035】

また、上記工程において、圧力差発生装置としては、注射器、ピペット、あるいはペリスタポンプのような加圧が可能なポンプ等、或いは、エバポレーター等の減圧可能なものが挙げられる。これらの内、手動操作には注射器が、自動操作にはポンプが適している。

また、ピペットは片手操作が容易にできるという利点を有する。好ましくは、圧力差発生装置は、核酸分離精製カートリッジの一の開口に着脱可能に結合されている。

【0036】

また、上記工程において、上記核酸分離精製カートリッジの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を減圧状態にしても好適に実施できる。また、核酸分離精製カートリッジに遠心力を作用させることによっても好適に実施することができる。

【0037】

【検体、およびDNAとRNAを含む核酸混合物溶液】

本発明において使用できる検体は、核酸を含むものであれば特に制限はなく、例えば診断分野においては、検体として採取された全血、血漿、血清、尿、便、精液、唾液等の体液、あるいは植物（又はその一部）、動物（またはその一部）、細菌、ウイルス、培養細胞、あるいはそれらの溶解物およびホモジネートなどの生物材料が対象となる。培養細胞としては、浮遊系細胞、接着系細胞等が挙げられる。浮遊系細胞とは培養液中で容器壁に付着することなく漂いながら生育、増殖する細胞を指し、例えばHL60、U937、HeLaS3等が代表的な細胞株として挙げられる。接着系細胞とは培養液中で容器壁底面に付着し生育、増殖する細胞を指し、例えばNIH3T3、HEK293、HeLa、COS、CHO細胞等が代表的な細胞株として挙げられる。検体として用いられる動物（またはその一部）としては、動物組織が挙げられる。例えば、動物を解剖したとき或いは生検により採取可能な、肝臓、腎臓、脾臓、脳、心臓、肺や胸腺など個体を構成する組織全てを使用することができる。

【0038】

これらの検体は、細胞膜・核膜を溶解して核酸を溶出する試薬を含む水溶液、いわゆる核酸可溶化試薬で処理することが好ましい。これにより細胞膜・核膜が溶解されて、核酸が水溶液内に分散した核酸混合物溶液を得ることができる。

【0039】

以下の工程で核酸混合物溶液を得ることが好ましい。

（I） 検体を容器に注入する工程

（II） 前記容器に、核酸可溶化試薬を添加し、検体と核酸可溶化試薬を混合する工程

（III） 前記で得られた混合液に水溶性有機溶媒を添加する工程

【0040】

核酸可溶化試薬としては、カオトロピック塩、核酸安定化剤、界面活性剤、緩衝剤及び消泡剤から選ばれる少なくとも一つを含む溶液が挙げられる。

【0041】

カオトロピック塩としては、特に限定は無く公知のカオトロピック塩を使用することができる。カオトロピック塩としては、グアニジン塩、イソチアン酸ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム等を使用することができる。中でもグアニジン塩が好ましい。グアニジン塩としては、塩酸グアニジン、イソチオシアン酸グアニジン、グアニジンチオシアン酸塩（チオシアン酸グアニジン）が挙げられ、中でも塩酸グアニジンまたはグアニジンチオシアン酸塩が好ましい。これらの塩は単独でも、複数組み合わせ用いてもよい。

核酸可溶化試薬中のカオトロピック塩濃度は、 0.5 mol/L 以上であることが好ましく、より好ましくは $0.5\text{ mol/L} \sim 8\text{ mol/L}$ 、さらに好ましくは、 $1\text{ mol/L} \sim 6\text{ mol/L}$ である。

カオトロピック塩の代わりに、カオトロピック物質として尿素を用いることもできる。

【0042】

核酸可溶化試薬は、核酸安定化剤を含むことが好ましい。核酸安定化剤は、検体中の核酸を安定に存在させることができ、好ましい。より好ましくは、カオトロピック塩、界面活性剤、緩衝剤および消泡剤の中から選ばれるいずれか1つ以上と共存させる。これにより、最終的に得られるRNAの回収量及び回収効率が向上し、検体の微量化及び迅速化が可能となり、好ましい。

核酸安定化剤としては、ヌクレアーゼの活性を不活性化させる作用を有するものが挙げられる。検体によっては、核酸を分解するヌクレアーゼ等が含まれていることがあり、核酸をホモジナイズすると、このヌクレアーゼが核酸に作用し、収量が激減することがある。

ヌクレアーゼの活性を不活性化させる作用を有する核酸安定化剤としては、一般的に還元剤として使用される化合物を用いることができる。還元剤としては、水素、ヨウ化水素、硫化水素、水素化アルミニウムリチウム、水素化ホウ素ナトリウム等の水素化合物、アルカリ金属、マグネシウム、カルシウム、アルミニウム、亜鉛等の電気的陽性の大きい金属、またはそのアマルガム、アルデヒド類、糖類、ギ酸、シュウ酸などの有機酸化合物、メルカプト化合物等が挙げられる。中でもメルカプト化合物が好ましい。メルカプト化合物としては、N-アセチルシステイン、メルカプトエタノールや、アルキルメルカプタン等が挙げられる。メルカプト化合物は単独または複数組み合わせ用いてもよい。

核酸安定化剤は、核酸可溶化試薬における濃度は $0.1 \sim 20$ 質量%であることが好ましく、より好ましくは、 $0.3 \sim 15$ 質量%で用いることができる。メルカプト化合物は、核酸可溶化試薬における濃度は $0.1 \sim 20$ 質量%であることが好ましく、より好ましくは、 $0.5 \sim 15$ 質量%で用いることができる。

【0043】

界面活性剤としては、例えば、アニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、アニオン界面活性剤、両性界面活性剤が挙げられる。

本発明においてはアニオン界面活性剤およびカチオン界面活性剤を好ましく用いることができる。

アニオン界面活性剤としては、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系界面活性剤、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤、脂肪酸アルカノールアミドが挙げられ、好ましくは、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤である。ポリオキシエチレン(POE)アルキルエーテル系界面活性剤の中でも、POEデシルエーテル、POEラウリルエーテル、POEトリデシルエーテル、POEアルキレンデシルエーテル、POEソルビタンモノラウレート、POEソルビタンモノオレエート、POEソルビタンモノステアレート、テトラオレイン酸ポリオキシエチレンソルビット、POEアルキルアミン、POEアセチレングリコールがさらに好ましい。

カチオン界面活性剤としては、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムクロリド、テトラデシルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルピリジニウムクロリドが挙げられる。

これらの界面活性剤は、単独または複数組み合わせ用いてもよい。界面活性剤の核酸可溶化試薬における濃度は $0.1 \sim 20$ 質量%であることが好ましい。

【0044】

前記核酸可溶化試薬は、好ましくは $\text{pH} 3 \sim 8$ 、より好ましくは $\text{pH} 4 \sim 7$ 、さらに好ましくは $\text{pH} 5 \sim 7$ のものが用いられる。

【0045】

緩衝剤としては、通常用いられる pH 緩衝剤(buffer)を挙げることができる。好ましくは、生化学用の pH 緩衝剤が挙げられる。このような緩衝剤としては、クエン酸

塩、リン酸塩または酢酸塩を含む緩衝剤、Tris-HCl、TE (Tris-HCl/EDTA)、TBE (Tris-Borate/EDTA)、TAE (Tris-Acetate/EDTA)、グッド緩衝剤が挙げられる。グッド緩衝剤としては、MES (2-Morpholinoethanesulfonic acid)、Bis-Tris (Bis (2-hydroxyethyl) iminotris (hydroxymethyl) methane)、HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid)、PIPES (Piperazine-1, 4-bis (2-ethanesulfonic acid))、ACES (N-(2-Acetamino)-2-aminoethanesulfonic acid)、CAPS (N-Cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid)、TES (N-Tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethanesulfonic acid) が挙げられる。

これらの緩衝剤は、前記核酸可溶化試薬中の濃度は1~500 mmol/Lであることが好ましい。

【0046】

消泡剤としては、シリコン系消泡剤（例えば、シリコンオイル、ジメチルポリシロキサン、シリコンエマルジョン、変性ポリシロキサン、シリコンコンバウンドなど）、アルコール系消泡剤（例えば、アセチレングリコール、ヘプタノール、エチルエキサノール、高級アルコール、ポリオキシアルキレングリコールなど）、エーテル系消泡剤（例えば、ヘプチルセロソルブ、ノニルセロソルブ-3-ヘプチルコルビトールなど）、油脂系消泡剤（例えば、動植物油など）、脂肪酸系消泡剤（例えば、ステアリン酸、オレイン酸、パルミチン酸など）、金属セッケン系消泡剤（例えば、ステアリン酸アルミ、ステアリン酸カルシウムなど）、脂肪酸エステル系消泡剤（例えば、天然ワックス、トリブチルホスフェートなど）、リン燐酸エステル系消泡剤（例えば、オクチルリン酸ナトリウムなど）、アミン系消泡剤（例えば、ジアミルアミンなど）、アミド系消泡剤（例えば、ステアリン酸アミドなど）、その他の消泡剤（例えば、硫酸第二鉄、ボーキサイトなど）などが挙げられる。これらの消泡剤は、単独または複数組み合わせる用いてもよい。特に好ましくは、シリコン系消泡剤とアルコール系消泡剤の2つの成分を組み合わせる使用することである。

消泡剤の核酸可溶化試薬における濃度は0.1~10質量%であることが好ましい。

【0047】

また、前記の核酸可溶化試薬は水溶性有機溶媒を含んでいても良い。水溶性有機溶媒としては、アセトン、アルコール類、ジメチルホルムアミド等が挙げられる。核酸可溶化試薬に含まれる各種試薬の溶解性を上げることができ、好ましい。中でも、アルコール類が好ましい。アルコール類は、1級アルコール、2級アルコール、3級アルコールのいずれでも良い。とりわけメタノール、エタノール、プロパノール及びその異性体、ブタノール及びその異性体をより好ましく用いることができる。これらの水溶性有機溶媒は単独でも複数組み合わせる用いてもよい。これら水溶性有機溶媒の核酸可溶化試薬における濃度は1~20質量%であることが好ましい。

【0048】

検体は、核酸可溶化試薬を添加する前に予めホモジナイズ処理することが好ましい。ホモジナイズ処理することで自動化処理適正が向上し、好ましい。ホモジナイズ処理は、例えば、超音波処理、鋭利な突起物を用いる処理、高速攪拌処理を用いる処理、微細空隙から押し出す処理、ガラス、ステンレス、ジルコニアなどのビーズを用いる処理等で行うことができる。

【0049】

ホモジナイズした検体と核酸可溶化試薬とを混合する方法は、特に限定されない。例えば、混合する際、攪拌装置により30から3000rpmで1秒から3分間混合することが好ましい。これにより、最終的に分離精製されるRNA収量を好適に増加させることが

できる。または、転倒混和を5から30回行うことで混合することも好ましい。また、ビベティング操作を、10から50回行うことによっても混合することができ、この場合、簡便な操作で最終的に分離精製されるRNA収量を増加させることができ、好ましい。

【0050】

核酸可溶化試薬で処理して得られた混合液に、水溶性有機溶媒を添加することが好ましい。水溶性有機溶媒としては、特に限定は無いが、アルコール類を好ましく用いることができる。アルコール類としては、1級アルコール、2級アルコール、3級アルコールのいずれでもよく、メタノール、エタノール、プロパノール又はその異性体、ブタノール又はその異性体を好ましく用いることができる。これら水溶性有機溶媒は、単独でも複数組み合わせ合わせて用いてもよい。水溶性有機溶媒の核酸混合物溶液における最終濃度は、5～90質量%であることが好ましい。

【0051】

また、得られた核酸混合物溶液は、表面張力は 0.05 J/m^2 以下であることが好ましく、また、粘度は、 $1\sim10000\text{ mPa}$ であることが好ましく、比重は、 $0.8\sim1.2$ の範囲であることが好ましい。この範囲の溶液にすることで、次の工程において、核酸混合物溶液を核酸吸着性多孔性膜に通過させて、核酸を吸着させた後に、核酸混合物溶液残渣を除去しやすくする。

【0052】

(a) 核酸吸着性多孔性膜に核酸を吸着させる工程（吸着工程）

以下に、本発明で用いる核酸吸着性多孔性膜および(a)核酸吸着性多孔性膜に核酸を吸着させる工程について説明する。

本発明の核酸吸着性多孔性膜は、溶液が内部を通過可能なものである。ここで「溶液が内部を通過可能」とは、膜の一方の面が接する空間と膜の他方の面が接する空間の間に圧力差を生じさせた場合に、高圧の空間側から低圧の空間側へと、膜の内部を溶液が通過することが可能であることを意味する。または、膜に遠心力を掛けた場合に、遠心力の方向に、膜の内部を溶液が通過することが可能であることを意味する。

【0053】

また、本発明の核酸吸着性多孔性膜は、イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着する多孔性膜であることが好ましい。これは、多孔性膜側の使用条件で「イオン化」していないことを意味し、環境の極性を変化させることで、核酸と多孔性膜が引き合うようになると推定される。これにより分離性能に優れ、しかも洗浄効率よく、核酸を単離精製することができ、好ましい。さらに好ましくは、核酸吸着性多孔性膜は、親水基を有する多孔性膜であり、環境の極性を変化させることで、核酸と多孔性膜の親水基同士が引きあうようになると推定される。

【0054】

ここで親水基とは、水との相互作用を持つことができる有極性の基（原子団）を指し、核酸の吸着に関与する全ての基（原子団）が当てはまる。親水基としては、水との相互作用の強さが中程度のもの（化学大事典、共立出版株式会社発行、「親水基」の項の「あまり親水性の強くない基」参照）が良く、例えば、水酸基、カルボキシル基、シアノ基、オキシエチレン基などを挙げることができる。好ましくは水酸基である。

【0055】

ここで親水基を有する多孔性膜とは、多孔性膜を形成する材料自体が親水基を有する多孔性膜、または多孔性膜を形成する材料を処理またはコーティングすることによって親水基を導入した多孔性膜を意味する。多孔性膜を形成する材料は有機物、無機物のいずれでも良い。例えば、多孔性膜を形成する材料自体が親水基を有する有機材料である多孔性膜、親水基を持たない有機材料の多孔性膜を処理して親水基を導入した多孔性膜、親水基を持たない有機材料の多孔性膜に対し親水基を有する材料でコーティングして親水基を導入した多孔性膜、多孔性膜を形成する材料自体が親水基を有する無機材料である多孔性膜、親水基を持たない無機材料の多孔性膜を処理して親水基を導入した多孔性膜、親水基を持たない無機材料の多孔性膜に対し親水基を有する材料でコーティングして親水基を導入し

た多孔性膜などを使用することができるが、加工の容易性から、多孔性膜を形成する材料は有機高分子などの有機材料を用いることが好ましい。

【0056】

親水基を有する材料の多孔性膜としては、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリオキシエチレン、アセチルセルロース、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物などで、形成された多孔性膜を挙げることができるが、特に水酸基を有する有機材料の多孔性膜、とりわけ水酸基を有する有機高分子からなる多孔性膜を好ましく使用することができる。

【0057】

水酸基を有する有機材料の多孔性膜として、多糖構造を有する材料が好ましく、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の多孔性膜をより好ましく使用することができる。アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物として、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物、トリアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物、ジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物を好ましく使用する事ができる。特にトリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物を好ましく使用することができる。トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比（質量比）は、99：1～1：99である事が好ましく、90：10～50：50である事がより好ましい。

【0058】

更に好ましい水酸基を有する有機材料としては、特開2003-128691号公報に記載のアセチルセルロースの鹼化物が挙げられる。アセチルセルロースの鹼化物とは、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物を鹼化処理したものであり、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物の鹼化物、トリアセチルセルロースとモノアセチルセルロース混合物の鹼化物、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースとモノアセチルセルロース混合物の鹼化物、ジアセチルセルロースとモノアセチルセルロース混合物の鹼化物も好ましく使用することができる。より好ましくは、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物の鹼化物を使用することである。トリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物の混合比（質量比）は、99：1～1：99であることが好ましい。更に好ましくは、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物の混合比は、90：10～50：50であることである。この場合、鹼化処理の程度（鹼化率）で多孔性膜表面の水酸基の量（密度）をコントロールすることができる。

核酸の分離効率をあげるためには、水酸基の量（密度）が多いことが好ましい。鹼化処理により得られる有機材料の鹼化率（表面鹼化率）が5%以上100%以下であることが好ましく、10%以上100%以下であることが更に好ましい。

また、水酸基を有する有機材料の表面積を大きくするために、アセチルセルロースの多孔性膜を鹼化処理することが好ましい。

多孔性膜は、表裏対称性の多孔性膜であってもよいが、表裏非対称性の多孔性膜を好ましく使用することができる。

【0059】

ここで、鹼化処理とは、アセチルセルロースを鹼化処理液（例えば水酸化ナトリウム水溶液）に接触させることを言う。これにより、鹼化処理液に接触したセルロースのエステル誘導体のエステル基が加水分解され、水酸基が導入され再生セルロースとなる。こうして作成された再生セルロースは、本来のセルロースとは、結晶状態等の点で異なっている。また、鹼化率を変えるには、水酸化ナトリウムの濃度や処理時間を変えて鹼化処理を行えば良い。鹼化率は、NMRにより、容易に測定することができる（例えば、カルボニル基のピーク減少の程度で定めることができる）。

【0060】

親水基を持たない有機材料の多孔性膜に親水基を導入する方法として、ポリマー鎖内ま

たは側鎖に親水基を有するグラフトポリマー鎖を多孔性膜に結合することができる。有機材料の多孔性膜にグラフトポリマー鎖を結合する方法としては、多孔性膜とグラフトポリマー鎖とを化学結合させる方法と、多孔性膜を起点として重合可能な二重結合を有する化合物を重合させグラフトポリマー鎖とする2つの方法がある。

【0061】

まず、多孔性膜とグラフトポリマー鎖とを化学結合させる方法においては、ポリマーの末端または側鎖に多孔性膜と反応する官能基を有するポリマーを使用し、この官能基と、多孔性膜の官能基とを化学反応させることでグラフトさせることができる。多孔性膜と反応する官能基としては、多孔性膜の官能基と反応し得るものであれば特に限定はないが、例えば、アルコキシシランのようなシランカップリング基、イソシアネート基、アミノ基、水酸基、カルボキシル基、スルホン酸基、リン酸基、エポキシ基、アリル基、メタクリロイル基、アクリロイル基等を挙げることができる。ポリマーの末端、または側鎖に反応性官能基を有するポリマーとして特に有用な化合物は、トリアルコキシシリル基をポリマー末端に有するポリマー、アミノ基をポリマー末端に有するポリマー、カルボキシル基をポリマー末端に有するポリマー、エポキシ基をポリマー末端に有するポリマー、イソシアネート基をポリマー末端に有するポリマーが挙げられる。この時に使用されるポリマーとしては、核酸の吸着に関与する親水基を有するものであれば特に限定はないが、具体的には、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸及びそれらの塩、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸及びそれらの塩、ポリオキシエチレンなどを挙げることができる。

【0062】

多孔性膜を起点として重合可能な二重結合を有する化合物を重合させ、グラフトポリマー鎖とする方法は、一般的には表面グラフト重合と呼ばれる。表面グラフト重合法とは、プラズマ照射、光照射、加熱などの方法で多孔性膜表面上に活性種を与え、多孔性膜と接するように配置された重合可能な二重結合を有する化合物を重合によって多孔性膜と結合させる方法を指す。多孔性膜に結合するグラフトポリマー鎖を形成するのに有用な化合物は、重合可能な二重結合を有しており、核酸の吸着に関与する親水基を有するという、2つの特性を兼ね備えていることが必要である。これらの化合物としては、分子内に二重結合を有していれば、親水基を有するポリマー、オリゴマー、モノマーのいずれの化合物をも用いることができる。特に有用な化合物は親水基を有するモノマーである。特に有用な親水基を有するモノマーの具体例としては、次のモノマーを挙げることができる。例えば、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、グリセロールモノメタクリレート等の水酸性基含有モノマーを特に好ましく用いることができる。また、アクリル酸、メタアクリル酸等のカルボキシル基含有モノマー、もしくはそのアルカリ金属塩及びアミン塩も好ましく用いることができる。

【0063】

親水基を持たない有機材料の多孔性膜に親水基を導入する別の方法として、親水基を有する材料をコーティングすることができる。コーティングに使用する材料は、核酸の吸着に関与する親水基を有するものであれば特に限定はないが、作業の容易さから有機材料のポリマーが好ましい。ポリマーとしては、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸及びそれらの塩、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸及びそれらの塩、ポリオキシエチレン、アセチルセルロース、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物などを挙げることができるが、多糖構造を有するポリマーが好ましい。

【0064】

また、親水基を持たない有機材料の多孔性膜に、アセチルセルロースまたは、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物をコーティングした後に、コーティングしたアセチルセルロースまたはアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物を鹼化処理することもできる。この場合、鹼化率が5%以上100%以下であることが好ましい。さらには、鹼化率が10%以上100%以下であることが好ましい。

【0065】

親水基を有する無機材料である多孔性膜としては、シリカ化合物を含有する多孔性膜を挙げることができる。シリカ化合物を含有する多孔性膜としては、ガラスフィルターを挙げることができる。また、特許公報第3058342号に記載されているような、多孔質のシリカ薄膜を挙げることができる。この多孔質のシリカ薄膜とは、二分子膜形成能を有するカチオン型の両親媒性物質の展開液を基板上に展開した後、基板上の液膜から溶媒を除去することによって両親媒性物質の多層二分子膜薄膜を調整し、シリカ化合物を含有する溶液に多層二分子膜薄膜を接触させ、次いで前記多層二分子膜薄膜を抽出除去することで作製することができる。

【0066】

親水基を持たない無機材料の多孔性膜に親水基を導入する方法としては、多孔性膜と親水基をもつグラフトポリマー鎖とを化学結合させる方法と、分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーを使用して、多孔性膜を起点として、グラフトポリマー鎖を重合する2つの方法がある。

多孔性膜と親水基をもつグラフトポリマー鎖とを化学結合させる場合は、グラフトポリマー鎖の末端の官能基と反応する官能基を無機材料に導入し、そこにグラフトポリマーを化学結合させる。また、分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーを使用して、多孔性膜を起点として、グラフトポリマー鎖を重合する場合は、二重結合を有する化合物を重合する際の起点となる官能基を無機材料に導入する。

【0067】

親水基を持つグラフトポリマー、および分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーとしては、上記親水基を持たない有機材料の多孔性膜に親水基を導入する方法において記載した、親水基を有するグラフトポリマー、および分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーを好ましく使用することができる。

【0068】

親水基を持たない無機材料の多孔性膜に親水基を導入する別の方法として、親水基を有する材料をコーティングすることができる。コーティングに使用する材料は、核酸の吸着に関与する親水基を有するものであれば特に限定はないが、作業の容易さから有機材料のポリマーが好ましい。ポリマーとしては、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸及びそれらの塩、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸及びそれらの塩、ポリオキシエチレン、アセチルセルロース、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物などを挙げることができる。

【0069】

また、親水基を持たない無機材料の多孔性膜に、アセチルセルロースまたは、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物をコーティングした後に、コーティングしたアセチルセルロースまたはアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物を鹼化処理することもできる。この場合、鹼化率が5%以上100%以下であることが好ましい。さらには、鹼化率が約10%以上100%以下であることが好ましい。

【0070】

親水基を持たない無機材料の多孔性膜としては、アルミニウム等の金属、ガラス、セメント、陶磁器等のセラミックス、もしくはニューセラミックス、シリコン、活性炭等を加工して作製した多孔性膜を挙げることができる。

【0071】

上記の核酸吸着性多孔性膜は、溶液が内部を通過可能であり、厚さが10 μ m～500 μ mであることが好ましい。さらに好ましくは、厚さが50 μ m～250 μ mである。洗浄がし易い点で、厚さが薄いほど好ましい。

【0072】

上記の、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜は、最小孔径が0.22 μ m以上であることが好ましい。さらに好ましくは、最小孔径が0.5 μ m以上である。また、最

大孔径と最小孔径の比が2以上である多孔性膜を用いる事が好ましい。これにより、核酸が吸着するのに十分な表面積が得られるとともに、目詰まりし難い。さらに好ましくは、最大孔径と最小孔径の比が5以上である。

【0073】

上記の、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜は、空隙率が50～95%であることが好ましい。さらに好ましくは、空隙率が65～80%である。また、バブルポイントが、 $0.1 \sim 10 \text{ kgf/cm}^2$ である事が好ましい。さらに好ましくは、バブルポイントが、 $0.2 \sim 4 \text{ kgf/cm}^2$ である。

【0074】

上記の、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜は、圧力損失が、 $0.1 \sim 100 \text{ kPa}$ である事が好ましい。これにより、過圧時に均一な圧力が得られる。さらに好ましくは、圧力損失が、 $0.5 \sim 50 \text{ kPa}$ である。ここで、圧力損失とは、膜の厚さ $100 \mu\text{m}$ あたり、水を通過させるのに必要な最低圧力である。

【0075】

上記の、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜は、 25°C で 1 kg/cm^2 の圧力で水を通過させたときの透水量が、膜 1 cm^2 あたり1分間で $1 \sim 5000 \text{ mL}$ であることが好ましい。さらに好ましくは、 25°C で 1 kg/cm^2 の圧力で水を通過させたときの透水量が、膜 1 cm^2 あたり1分間で $5 \sim 1000 \text{ mL}$ である。

【0076】

上記の、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜は、多孔性膜 1 mg あたりの核酸の吸着量が $0.1 \mu\text{g}$ 以上である事が好ましい。さらに好ましくは、多孔性膜 1 mg あたりの核酸の吸着量が $0.9 \mu\text{g}$ 以上である。

【0077】

上記の、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜は、一辺が 5 mm の正方形の多孔性膜をトリフルオロ酢酸 5 mL に浸漬したときに、1時間以内では溶解しないが48時間以内に溶解するセルロース誘導体が、好ましい。また、一辺が 5 mm の正方形の多孔質膜をトリフルオロ酢酸 5 mL に浸漬したときに1時間以内に溶解するが、ジクロロメタン 5 mL に浸漬したときには24時間以内に溶解しないセルロース誘導体も好ましい。中でも、一辺が 5 mm の正方形の多孔質膜をトリフルオロ酢酸 5 mL に浸漬したときに1時間以内に溶解するが、ジクロロメタン 5 mL に浸漬したときには24時間以内に溶解しないセルロース誘導体がより好ましい。

【0078】

核酸吸着性多孔性膜中を、核酸混合物溶液を通過させる場合、核酸混合物溶液を一方の面から他方の面へと通過させることが、液を多孔性膜へ均一に接触させることができる点で、好ましい。核酸吸着性多孔性膜中を、核酸混合物溶液を通過させる場合、核酸混合物溶液を核酸吸着性多孔性膜の孔径が大きい側から小さい側に通過させることが、目詰まりし難い点で好ましい。

【0079】

核酸混合物溶液を核酸吸着性多孔性膜に通過させる場合の流速は、液の多孔性膜への適切な接触時間を得るために、膜の面積 cm^2 あたり、 $2 \sim 1500 \mu\text{L/sec}$ である事が好ましい。液の多孔性膜への接触時間が短すぎると十分な分離精製効果が得られず、長すぎると操作性の点から好ましくない。さらに、上記流速は、膜の面積 cm^2 あたり、 $5 \sim 700 \mu\text{L/sec}$ である事が好ましい。

【0080】

また、使用する溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜は、1枚であってもよいが、複数枚を使用することもできる。複数枚の核酸吸着性多孔性膜は、同一のものであっても、異なるものであっても良い。

【0081】

複数枚の核酸吸着性多孔性膜は、無機材料の核酸吸着性多孔性膜と有機材料の核酸吸着性多孔性膜との組合せであっても良い。例えば、ガラスフィルターと再生セルロースの多

孔性膜との組合せを挙げることができる。また、複数枚の核酸吸着性多孔性膜、無機材料の核酸吸着性多孔性膜と有機材料の核酸非吸着性多孔性膜との組合せであってもよい、例えば、ガラスフィルターと、ナイロンまたはポリスルホンの多孔性膜との組合せを挙げることができる。

【0082】

少なくとも二個の開口を有する容器内に、上記のような溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジを好ましく使用することができる。また、少なくとも二個の開口を有する容器内に、上記のような溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜を複数枚収容した核酸分離精製カートリッジを好ましく使用することができる。この場合、少なくとも二個の開口を有する容器内に収容される複数枚の核酸吸着性多孔性膜は、同一のものであっても、異なるものであっても良い。

【0083】

核酸分離精製カートリッジは、少なくとも二個の開口を有する容器内に、上記のような溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜を収容する以外、その他の部材を収容していないことが好ましい。上記の容器の材料としては、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリ塩化ビニルなどのプラスチックを使用することができる。また、生分解性の材料も好ましく使用することができる。また、上記の容器は透明であっても、着色してあっても良い。

【0084】

核酸分離精製カートリッジとして、個々の核酸分離精製カートリッジを識別する手段を備えている核酸分離精製カートリッジを使用する事ができる。個々の核酸分離精製カートリッジを識別する手段としては、バーコード、二次元バーコード、磁気テープ、ICカードなどが挙げられる。

【0085】

また、少なくとも二個の開口を有する容器内から核酸吸着性多孔性膜を容易に取り出す事が可能になっている構造を有した核酸分離精製カートリッジを使用することもできる。

【0086】

(b) 洗浄液により核酸が吸着した状態で核酸吸着性多孔性膜を洗浄する工程（洗浄工程1）

以下、(b) 洗浄液により核酸が吸着した状態で核酸吸着性多孔性膜を洗浄する工程について説明する。

洗浄工程により、最終的に得られるRNAの回収量及び純度が向上し、必要なRNAを含む検体の量を微量とすることができる。また、洗浄や回収操作を自動化することによって、操作を簡便かつ迅速に行うことが可能になる。洗浄工程は、迅速化のためには1回の洗浄で済ませてもよく、また純度がより重要な場合には複数回洗浄を繰返すことが好ましい。

【0087】

洗浄工程において、洗浄液は、チューブ、ピペット、又は自動注入装置、もしくはこれらと同じ機能をもつ供給手段を使用して、核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジへ供給される。供給された洗浄液は、核酸分離精製カートリッジの一の開口（核酸混合物溶液を注入した開口）から供給され、該開口に結合された圧力差発生装置（例えばスボイド、注射器、ポンプ、パワーピペットなど）を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にして核酸吸着性多孔性膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出させることができる。また、洗浄液を一の開口から供給し、同じ一の開口より排出させることもできる。さらには、核酸分離精製カートリッジの核酸混合物溶液を供給した一の開口と異なる開口より洗浄液を供給し、排出させることも可能である。中でも、核酸分離精製カートリッジの一の開口から供給し、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出させることが、洗浄効率が優れてより好ましい。

洗浄工程における洗浄液の液量は、 $2\mu\text{l}/\text{mm}^2$ 以上が好ましい。洗浄液量が多量であれば洗浄効果は向上する。しかし、 $200\mu\text{l}/\text{mm}^2$ 以下とすることで、操作性を保

ち、試料の流出を抑止することができ、好ましい。

【0088】

洗浄工程において、洗浄液を核酸吸着性多孔性膜に通過させる場合の流速は、膜の単位面積 (cm^2) あたり、 $2 \sim 1500 \mu\text{L}/\text{sec}$ であることが好ましく、 $5 \sim 700 \mu\text{L}/\text{sec}$ であることがより好ましい。通常、通過速度を下げて時間を掛ければ洗浄がそれだけ十分に行なわれることになる。しかし、本発明では前記の範囲とすることで、洗浄効率を落とすことなく、RNAの分離精製操作を迅速化でき、好ましい。

【0089】

洗浄工程において、洗浄液の液温は $4 \sim 70^\circ\text{C}$ であることが好ましい。さらには、洗浄液の液温を室温とすることがより好ましい。また洗浄工程において、洗浄工程と同時に核酸分離精製カートリッジに器械的な振動や超音波による攪拌を与えることもできる。または遠心分離を行うことにより洗浄することもできる。

【0090】

洗浄工程において、洗浄液は、水溶性有機溶媒及び水溶性塩の少なくともいずれかを含んでいる溶液であることが好ましい。洗浄液は、核酸吸着性多孔性膜に核酸と共に吸着した核酸混合物溶液中の不純物を洗い流す機能を有する必要がある。そのためには、核酸吸着性多孔性膜から核酸は脱着させないが不純物は脱着させる組成であることが必要である。この目的には、核酸はアルコール等の水溶性有機溶媒に対し難溶性であるので、核酸を保持したまま核酸以外の成分を脱着させるのに水溶性有機溶媒が適している。また、水溶性塩を添加することにより、核酸の吸着効果が高まるので、不純物および不要成分の選択的除去作用を向上することができる。

【0091】

洗浄液に含まれる水溶性有機溶媒としては、アルコールを用いることができる。アルコールとしては、メタノール、エタノール、イソプロパノール、*n*-イソプロパノール、ブタノールが挙げられる。プロパノールとしては、イソプロパノール、*n*-プロパノールのいずれでもよく、ブタノールも直鎖状でも分岐状でもいずれでもよい。これらアルコールは、複数種類を使用することもできる。中でもエタノールを用いることが好ましい。

洗浄液中に含まれる水溶性有機溶媒の量は、 $5 \sim 100$ 質量%であることが好ましく、 $5 \sim 40$ 質量%であることがより好ましい。この範囲で、DNAのコンタミネーションが増大することなく、目的のRNAが多孔性膜から脱着することがなく、したがって、RNAを純度よく、回収量を高くすることができ好ましい。

【0092】

一方、洗浄液に含まれる水溶性塩は、ハロゲン化物の塩であることが好ましく、中でも塩化物が好ましい。また、水溶性塩は、一価または二価のカチオンであることが好ましく、特にアルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩が好ましく、中でもナトリウム塩及びカリウム塩が好ましく、ナトリウム塩が最も好ましい。

水溶性塩が洗浄液中に含まれる場合、その濃度は 10 mmol/L 以上であることが好ましく、その上限は不純物の溶解性を損なわない範囲であれば特に問わないが、 1 mol/L 以下であることが好ましく、 0.1 mol/L 以下であることがより好ましい。よりさらに好ましくは、水溶性塩が塩化ナトリウムであり、とりわけ、塩化ナトリウムが 20 mmol/L 以上含まれていることが好ましい。

【0093】

洗浄液は、カオトロピック物質を含んでいないことが好ましい。これによって、(e) 回収工程においてカオトロピック物質が混入する可能性を減らすことができる。回収工程時に、カオトロピック物質が混入すると、しばしばRT-PCR反応等を行う場合の酵素反応を阻害するので、後に酵素反応等を行う場合を考慮すると洗浄液にカオトロピック物質を含まないことが理想的である。また、カオトロピック物質は、腐食性があり有害であるので、この点でもカオトロピック物質を用いないで済むことは、実験者にとっても試験操作の安全上極めて有利である。

ここで、カオトロピック物質とは、前記した尿素、塩酸グアニジン、イソチオシアン酸

グアニジン、チオシアン酸グアニジン、イソチオシアン酸ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウムなどである。

【0094】

従来、核酸分離精製工程における洗浄工程の際、洗浄液がカートリッジなどの容器に対する濡れ性が高いため、しばしば洗浄液が容器中に残留することになり、回収工程の際に洗浄液が混入して核酸の純度の低下や次工程における反応性の低下などの原因となっている。したがって、カートリッジなどの容器を用いて核酸の吸着及び脱着を行う場合、吸着、洗浄時に用いる液、特に洗浄液が、次工程以降に影響を及ぼさないように、カートリッジ内に洗浄残液が残留しないことは重要である。

【0095】

したがって、洗浄工程における洗浄液が回収工程の回収液に混入することを防止して、洗浄液のカートリッジ内への残留を最小限に留めるため、洗浄液の表面張力を 0.035 J/m^2 未満にすることが好ましい。表面張力が低いと、洗浄液とカートリッジの濡れ性が向上し、残留する液量を抑えることができる。

【0096】

しかし、洗浄効率を上げる為に、水の割合を増やすことができるが、この場合、洗浄液の表面張力は上昇し、残留する液量が増える。洗浄液の表面張力が 0.035 J/m^2 以上の場合は、カートリッジの撥水性を高めることで、残留する液量を抑えることができる。カートリッジの撥水性を高めることで、液滴を形成させ、その液滴が流れ落ちることによって残留する液量を抑制できる。撥水性を高める方法としては、カートリッジ表面にシリコン等の撥水剤をコートするか、カートリッジ成型時にシリコン等の撥水剤を練り込む等の手段があるが、これに限らない。

【0097】

本発明に係る核酸吸着性多孔性膜を利用して洗浄工程を簡素化することができる。(1) 洗浄液が核酸吸着性多孔性膜を通過する回数を1回としてもよい、(2) 洗浄工程を室温でできる。(3) 洗浄工程の後、直ちに次工程を行うことができる。(4) 前記(1)、(2)、(3)のいずれか1つもしくは2つ以上組み合わせることも可能である。従来法においては、洗浄液中に含まれる有機溶媒を迅速に取り除くためには、しばしば乾燥工程を必要としたが、本発明に用いる核酸吸着性多孔性膜は薄膜であるために乾燥工程を省略できる。

【0098】

従来、RNAの分離精製方法において、洗浄工程の際、しばしば洗浄液が飛散し他に付着することによって、試料のコンタミネーション(汚染)が起きることが問題となっている。洗浄工程におけるこの種のコンタミネーションは、二個の開口を有する容器内に核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジと廃液容器の形状とを工夫することによって抑止することができる。

【0099】

(c) 核酸吸着性多孔性膜でDNaseを作用させる工程

以下、(c) 核酸吸着性多孔性膜でDNaseを作用させる工程について説明する。DNAとRNAを含む核酸混合物溶液からRNAのみを選択的に分離精製するには、核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジに通過させ、核酸吸着性多孔性膜に核酸を吸着させた(吸着工程)後、洗浄を行い(洗浄工程1)、DNaseを作用させる工程を経ることにより行うことができる。

DNaseは特に限定無く、いずれのDNaseも用いることができる。

本発明の方法は、核酸分離精製カートリッジの核酸吸着性多孔性膜でDNaseを作用させる工程におけるDNase溶液の全液量は、核酸吸着性多孔性膜 1 cm^2 当たり $130 \mu\text{l}$ 以下で行うものである。現在市販されている、例えばQIAGEN社製RNeasy Mini Kitでは、DNase溶液 $80 \mu\text{l}$ (核酸吸着性多孔性膜 1 cm^2 当たり $208 \mu\text{l}$)が必要である。したがって本発明ではより安価に精製することができることになる。また、核酸分離精製カートリッジの核酸吸着性多孔性膜でDNaseを作用させ

る工程においてDNase溶液におけるDNase濃度（以下、単にDNase濃度とも言う。）は10Kunitz U/mL以上10000Kunitz U/mL以下が好ましく、50Kunitz U/mL以上5000Kunitz U/mL以下がより好ましい。なお、ここで用いた活性Kunitz Uは、「DNAを基質として、25℃、pH5.0において反応液1mlのA₂₆₀の吸光度を1分間に0.001増加させるDNase活性を1Kunitz Uとする」と定義したものである。また、核酸分離精製カートリッジの核酸吸着性多孔性膜でDNaseを作用させる工程における時間は、DNAとRNAを含む核酸混合物溶液中のDNA量と作用させるDNase濃度により異なるが5秒～360分が好ましく、30秒～180分がより好ましい。また、核酸分離精製カートリッジの核酸吸着性多孔性膜でDNaseを作用させる工程における温度は4℃以上であればよく、10～50℃が好ましく、反応効率を高めるため高温、例えば50～70℃で行うこともできる。尚、「核酸吸着性多孔性膜でDNaseを作用させる」とは、核酸吸着性多孔性膜における、核酸が吸着している部位とDNaseを作用させることを意味し、「核酸吸着性多孔性膜で」とは、核酸吸着性多孔性膜上に限らず、多孔性膜における孔中や、膜の裏側の孔の出口等も含む。

【0100】

（d）洗浄液により核酸吸着性多孔性膜を洗浄する工程（洗浄工程2）

（d）洗浄液により核酸吸着性多孔性膜を洗浄する工程は、上記（c）の工程の後に行う。（d）の工程は、前記（b）の工程に準じて行う。（d）の工程を行う回数は1回以上である。

【0101】

（e）回収液により核酸吸着性多孔性膜内からRNAを脱着させ、上記カートリッジ容器外に排出する工程（回収工程）

以下に（e）回収液により核酸吸着性多孔性膜内からRNAを脱着させ、上記カートリッジ容器外に排出する工程について説明する。

回収液は、チューブ、ピペット、又は自動注入装置、もしくはこれらと同じ機能をもつ供給手段を使用して、核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジへ供給される。回収液は、核酸分離精製カートリッジの一の開口（核酸混合物溶液を注入した開口）から供給され、該開口に結合された圧力差発生装置（例えばスポイド、注射器、ポンプ、パワーピペットなど）を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にして核酸吸着性多孔性膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出させることができる。また、回収液を一の開口から供給し、同じ一の開口より排出させることもできる。さらには、核酸分離精製カートリッジの核酸混合物溶液を供給した一の開口と異なる開口より回収液を供給し、排出させることも可能である。中でも、核酸分離精製カートリッジの一の開口から供給し、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出する方法が、回収効率が優れてより好ましい。

【0102】

検体から調整した核酸混合物溶液の体積に対して、回収液の体積を調整してRNAの脱着を行うことができる。分離精製されたRNAを含む回収液量は、そのとき使用する検体量による。一般的によく使われる回収液量は数10から数100μlであるが、検体量が極微量である時や、逆に大量のRNAを分離精製したい場合には回収液量は1μlから数10mlの範囲で変える事ができる。

【0103】

回収液としては好ましくは精製蒸留水、Tris/EDTAバッファ等が使用できる。また、工程後に回収したRNAをRT-PCR（逆転写ポリメラーゼ連鎖反応）に供する場合、RT-PCR反応において用いる緩衝溶液（例えば、KCl 75mmol/L、Tris-HCl 50mmol/L、MgCl₂ 3.0mmol/L、DTT 10mmol/Lを最終濃度とする水溶液）を用いることもできる。

【0104】

回収液のpHは、pH1～10であることが好ましい。さらには、pH2～7であるこ

とが好ましい。また特にイオン強度と塩濃度は吸着RNAの溶出に効果を及ぼす。回収液は、 500 mmol/L 以下のイオン強度であることが好ましい。塩濃度は、 0.5 mol/L 以下であることが好ましく、さらには、 0.01 mmol/L 以上 50 mmol/L 以下であることが好ましい。こうすることで、RNAの回収率が向上し、より多くのRNAを回収できることができる。

【0105】

回収液の体積を当初の核酸混合物溶液の体積と比較して少なくすることによって、濃縮されたRNAを含む回収液を得ることができる。好ましくは、(回収液体積)：(核酸混合物溶液体積)＝1：100～99：100、更に好ましくは、(回収液体積)：(核酸混合物溶液体積)＝1：10～9：10にすることができる。これにより核酸分離精製後工程において濃縮のための操作をすることなく、簡単にRNAを濃縮できる。これらの方法により検体よりもRNAが濃縮されているRNA溶液を得る方法を提供できる。

【0106】

また別の態様としては、回収液の体積を当初の核酸混合物溶液よりも多い条件でRNAの脱着を行うことにより、希望の濃度のRNAを含む回収液を得ることができ、次工程、例えばRT-PCRなどを行う場合に適した濃度のRNAを含む回収液を得ることができる。好ましくは、(回収液体積)：(核酸混合物溶液体積)＝1：1～50：1、更に好ましくは、(回収液体積)：(核酸混合物溶液体積)＝1：1～5：1にすることができる。これにより核酸分離精製後に濃度調整をする煩雑さがなくなるというメリットを得られる。更に、十分量の回収液を使用することにより、多孔性膜からのRNA回収率の増加を図ることができる。

【0107】

また、目的に応じて回収液の温度を変化させることで簡便にRNAを回収することができる。例えば、回収液の温度を $0\sim10^{\circ}\text{C}$ にして多孔性膜からのRNAの脱着を行うことで、酵素による分解を防止する何らかの試薬や特別な操作を加えることなくRNA分解酵素の動きを抑制して、RNAの分解を防ぎ、簡便に、効率よくRNA溶液を得ることができる。

【0108】

また、回収液の温度を $10\sim35^{\circ}\text{C}$ とした場合、一般的な室温でRNAの回収を実施することが出来、複雑な工程を必要とせずにRNAを脱着させて分離精製することができる。

【0109】

また別の態様としては、回収液の温度を高温、例えば $35\sim70^{\circ}\text{C}$ することで、多孔性膜からのRNAの脱着を煩雑な操作を経ず簡便に高い回収率で実施することができる。

【0110】

回収液の注入回数は限定されるものではなく、1回でも複数回でもよい。通常、迅速、簡便にRNAを分離精製する場合は、1回の回収で実施するが、大量のRNAを回収する場合等複数回にわたり回収液を注入してもよい。

【0111】

回収工程においては、RNAの回収液をその後の工程に使用できる組成にしておくことが可能である。分離精製されたRNAは、しばしばRT-PCR（逆転写ポリメラーゼチェーンリアクション）法が適用される。この場合、分離精製されたRNA溶液はRT-PCR法に適したバッファー液で希釈する必要がある。本方法による回収工程において、回収液にRT-PCR法に適したバッファー液を用いることで、その後のRT-PCR工程へ簡便、迅速に移行することができる。

【0112】

また、回収工程において、RNAの回収液に回収したRNAの分解を防ぐための安定化剤を添加しておくことも可能である。安定化剤としては、抗菌剤、抗カビ剤や核酸分解抑制剤などを添加することができる。核酸分解抑制剤としては、核酸分解酵素の阻害剤が挙げられ、具体的にはEDTAなどが挙げられる。また別の実施態様として、回収容器にあ

らかじめ安定化剤を添加しておくこともできる。

【0113】

回収工程で用いられる回収容器には特に限定はないが、260nmの吸収が無い素材で作製された回収容器を用いることができる。この場合、回収したRNA溶液の濃度を、他の容器に移し替えずに測定できる。260nmに吸収のない素材は、例えば石英ガラス等が挙げられるがこれに限定されるものではない。

【0114】

前記のRNAの選択的分離精製方法に用いる、核酸分離精製カートリッジと、(a)～(e)の各工程に用いる試薬をキットとすることができる。

【0115】

上記の、少なくとも二個の開口を有する容器内に核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジと圧力差発生装置を用いて、核酸を含む検体からRNAを分離精製する方法はその含まれる工程を自動で行う自動装置を用いて行うことができる。また、前記のキットの使用を自動で行う自動装置を用いて行うことができる。自動装置により、操作が簡便化および迅速化するだけでなく、作業者の技能によらず一定の水準の、RNAを得ることが可能になる。

【0116】

以下に、少なくとも二個の開口を有する容器内に核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジと圧力差発生装置を用いて、核酸を含む検体からRNAを分離精製する工程を自動で行う自動装置の例を示すが、本発明の自動装置はこれに限定されるものではない。

【0117】

自動装置は、溶液が内部を通過可能な、核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジを用い、該核酸分離精製カートリッジにDNAとRNAを含む核酸混合物溶液を注入し加圧して該核酸混合物溶液中の核酸を前記核酸吸着性多孔性膜に吸着させた後、前記核酸分離精製カートリッジに洗浄液を分注し加圧して不純物を除去し、前記核酸分離精製カートリッジにDNaseを分注して核酸吸着性多孔性膜でDNaseを作用させ、加圧してDNaseが核酸吸着性多孔性膜内部を通過した後、前記核酸分離精製カートリッジに洗浄液を分注し、加圧して分解されたDNAを除去した後、前記核酸分離精製カートリッジに、回収液を分注し核酸吸着性多孔性膜に吸着したRNAを脱着して回収液とともに回収する、分離精製動作を自動的に行うRNAの選択的分離精製装置であって、前記核酸分離精製カートリッジ、前記核酸混合物溶液残渣、DNaseおよび洗浄液の排出液を収容する廃液容器および前記RNAを含む回収液を収容する回収容器を保持する搭載機構と、前記核酸分離精製カートリッジに加圧エアを導入する加圧エア供給機構と、前記核酸分離精製カートリッジに洗浄液、DNaseおよび回収液を分注する分注機構とを備えてなることが好適である。

【0118】

前記搭載機構は、装置本体に搭載されるスタンドと、該スタンドに上下移動可能に支持され前記核酸分離精製カートリッジを保持するカートリッジホルダーと、該カートリッジホルダーの下方で前記核酸分離精製カートリッジに対する位置を交換可能に前記廃液容器および前記回収容器を保持する容器ホルダーとを備えてなるものが好適である。

【0119】

また、前記加圧エア供給機構は、下端部より加圧エアを噴出するエアノズルと、該エアノズルを支持して前記カートリッジホルダーに保持された前記核酸分離精製カートリッジに対し前記エアノズルを昇降移動させる加圧ヘッドと、該加圧ヘッドに設置され前記搭載機構のラックにおける核酸分離精製カートリッジの位置決めをする位置決め手段とを備えてなるものが好適である。

【0120】

また、前記分注機構は、前記洗浄液を分注する洗浄液分注ノズルと、前記DNaseを分注するDNase分注ノズルと、前記回収液を分注する回収液分注ノズルと、前記洗浄

液分注ノズル、前記DNase分注ノズルおよび前記回収液分注ノズルを保持し前記搭載機構に保持された核酸分離精製カートリッジ上を順に移動可能なノズル移動台と、洗浄液を収容した洗浄液ボトルより洗浄液を吸引し前記洗浄液分注ノズルに供給する洗浄液供給ポンプと、DNaseを収容したDNaseボトルよりDNaseを吸引し前記DNase分注ノズルに供給するDNase供給ポンプと、回収液を収容した回収液ボトルより回収液を吸引し前記回収液分注ノズルに供給する回収液供給ポンプとを備えてなるものが好適である。

【0121】

核酸分離精製カートリッジ、廃液容器および回収容器を保持する搭載機構と、核酸分離精製カートリッジに加圧エアを導入する加圧エア供給機構と、核酸分離精製カートリッジに洗浄液、DNaseおよび回収液を分注する分注機構とを備えた、例えば前記のような自動装置によれば、核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジに核酸を含む試料液を注入加圧し核酸を核酸吸着性多孔性膜に吸着させ、洗浄液を分注して不純物を洗浄排出し、前記核酸分離精製カートリッジにDNaseを分注し核酸吸着性多孔性膜でDNaseを作用させ加圧してDNaseが核酸吸着性多孔性膜内部を通過し、前記核酸分離精製カートリッジに洗浄液を分注し加圧して分解されたDNAを除去し、回収液を分注して核酸吸着性多孔性膜に吸着したRNAを脱着して回収するRNA分離精製工程を自動的に行って、短時間で効率よく核酸混合物溶液中のRNAを自動的に分離精製できる機構をコンパクトに構成することができる。

【0122】

また、前記搭載機構を、スタンドと、核酸分離精製カートリッジを保持する上下移動可能なカートリッジホルダーと、廃液容器および回収容器を交換可能に保持する容器ホルダーとを備えて構成すると、核酸分離精製カートリッジおよび両容器のセット並びに廃液容器と回収容器の交換が簡易に行える。

【0123】

また、前記加圧エア供給機構を、エアノズルと、該エアノズルを昇降移動させる加圧ヘッドと、核酸分離精製カートリッジの位置決めをする位置決め手段とを備えて構成すると、簡易な機構で確実な加圧エアの供給が行える。

【0124】

また、前記分注機構を、洗浄液分注ノズルと、DNase分注ノズルと、回収液分注ノズルと、核酸分離精製カートリッジ上を順に移動可能なノズル移動台と、洗浄液ボトルより洗浄液を吸引し洗浄液分注ノズルに供給する洗浄液供給ポンプと、回収液ボトルより回収液を吸引し回収液分注ノズルに供給する回収液供給ポンプとを備えて構成すると、簡易な機構で順次洗浄液および回収液の分注が行える。

【実施例】

【0125】

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0126】

(1) 核酸精製カートリッジの作製

内径7mm、核酸吸着性多孔性膜を収容する部分を持つ核酸精製カートリッジを作製した。

【0127】

(2) 核酸吸着性多孔性膜として、トリアセチルセルロースの多孔性膜を酸化处理した多孔性膜を使用し、上記(1)で作成した核酸精製カートリッジの核酸吸着性多孔性膜収納部に収容した。

【0128】

【実施例1】

(3) 核酸可溶化試薬、洗浄液および回収液の調製

下記に示す処方の核酸可溶化試薬溶液A、洗浄液Aおよび回収液Aを調製した。

【0129】

(核酸可溶化試薬A)

塩酸グアニジン (ライフテクノロジー社製)

382 g

Tris (ライフテクノロジー社製)

12.1 g

Triton X-100 (ICN製)

10 g

蒸留水

1000 ml になるよう添加

【0130】

(洗浄液A)

10 mmol/L Tris-HCl

30 容量% エタノール

【0131】

(回収液A)

1 mmol/L Tris-HCl (pH 6.5)

【0132】

(4) 核酸混合物溶液調製

ヒト前骨髄性白血病細胞(HL60)を培養液(RPMI 1640-10%胎児牛血清)中5%CO₂存在下37℃で培養し調製した。細胞数が 1×10^6 個になるように調製し、Ca²⁺、Mg²⁺フリーPBSで細胞を洗浄した。4℃、300g、5分、スイングローターで遠心し、浮遊細胞をペレット状にした後、上清を除去し、タッピングによって細胞を再懸濁した。ここへ核酸可溶化試薬A 350 μlを加え、ボルテックスミキサーで1分間攪拌した。その後70%エタノール350 μlを加え、ボルテックスミキサーで5秒間攪拌し、実施例1の核酸混合物溶液を得た。

【0133】

(5) RNA分離精製操作

上記(4)で調製した核酸混合物溶液を、上記(1)及び(2)で作製した核酸吸着性多孔性膜を有する核酸精製カートリッジの一の開口に注入し、続いて上記一の開口に圧力差発生装置(シリンジポンプ)を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態(260 kPa)にし、注入した核酸混合物溶液を、核酸吸着性多孔性膜に通過させることで、核酸吸着性多孔性膜に接触させ、核酸分離精製カートリッジの他の開口より排出した。続いて、圧力差発生装置を外し、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に洗浄液A 500 μlを注入し、上記一の開口に圧力差発生装置(シリンジポンプ)を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態(260 kPa)にし、注入した洗浄液Aを核酸吸着性多孔性膜に通過させ、他の開口より排出した(洗浄工程1)。圧力差発生装置を外し、DNase溶液(QIAGEN社製RNase-Free DNase Set 341 Kunitz U/mLを使用)を膜上に10 μl(26 μl/cm²)アブライシ、室温で15分放置した。続いて、先と同様の洗浄を2回行った(洗浄工程2)。その後、圧力差発生装置を外し、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に回収液A 1000 μlを注入し、核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に圧力差発生装置(シリンジポンプ)を結合して核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態(260 kPa)にし、注入した回収液Aを核酸吸着性多孔性膜に通過させ、他の開口より排出し、この液を回収した。

また、DNase溶液の量10 μlを、20 μl、40 μlに変えた以外は同様にしてRNA分離精製操作を行った。さらに、参考例として、DNase溶液の量10 μlを、80 μlに変えた以外は同様にしてRNA分離精製操作を行った。

【0134】

[比較例1]

DNase溶液をアブライシなかったこと以外は実施例1と同様にしてRNAを抽出した。この際、洗浄工程については実施例1とは異なり、実施例1において洗浄工程1と洗浄工程2における合計洗浄回数3回を、連続で3回洗浄工程1のみで行った。

【0135】

[比較例2]

実施例1と同様に調製した培養細胞 (1×10^6 個) を用い、Q I A G E N 社製 R N e a s y M i n i K i t を用いて同キットのプロトコルに従い、R N A 抽出を行った。D N a s e 溶液はプロトコル通りの $80 \mu\text{l}$ ($208 \mu\text{l}/\text{cm}^2$) と、減量した $20 \mu\text{l}$ ($52 \mu\text{l}/\text{cm}^2$)、 $10 \mu\text{l}$ ($26 \mu\text{l}/\text{cm}^2$) の3通りで実施した。

【0136】

〔比較例3〕

D N a s e 溶液をアブライしなかったこと以外は比較例2と同様に、R N A を抽出した。このとき D N a s e 処理を行わない R N e a s y M i n i K i t プロトコルに従った。

【0137】

(6) 回収された核酸のアガロースゲル電気泳動

実施例1及び比較例1、2、3において回収された核酸を含む回収液を、1%アガロースゲルを用いて電気泳動した結果を図1～図3に示す。

【0138】

比較例2ではD N a s e 溶液を $80 \mu\text{l}$ ($208 \mu\text{l}/\text{cm}^2$) 必要とするが、実施例1では、比較例2で用いたD N a s e 溶液量より少ない量でもD N A が分解され、比較例1で検出されたD N A 由来のバンドが実施例1では検出されなかった。本発明では驚くべきことにD N a s e 溶液が $10 \mu\text{l}$ ($26 \mu\text{l}/\text{cm}^2$) であってもD N A を分解できた。

上記結果から、本発明では、少量のD N a s e 溶液でも、D N A とR N A を含む核酸混合物溶液中のD N A を分解し、R N A を選択的に回収できることが確認できた。

【0139】

〔実施例2〕

接着細胞としてH e L a 細胞を用いて以下のとおりO n - d i s h 法によって、核酸混合物溶液を得た。

培養細胞用プレートにてH e L a 細胞を培養液(M E M - 10%胎児牛血清)中5% C O ₂ 存在下37℃で培養し調製した。この培養細胞用プレートから培養液を除いた後、核酸可溶化試薬AをH e L a 細胞 1.5×10^6 個あたり $350 \mu\text{l}$ 添加し、細胞溶解液を得た。この細胞溶解液をピペッティングを行うことにより攪拌し別の容器に回収した。

この回収した液に70%エタノールを $350 \mu\text{l}$ 添加した後、約5秒間ボルテックスミキサーにより攪拌し、核酸混合物溶液を得た。得られた核酸混合物溶液を実施例1の(5)と同様にして、R N A 分離精製操作を行った。尚、D N a s e 溶液の量は $10 \mu\text{l}$ でR N A 分離精製操作を行った。

【0140】

〔実施例3〕

接着細胞としてH e L a 細胞を用いて以下のとおり剥離法によって、核酸混合物溶液を得た。

接着細胞培養用容器にてH e L a 細胞を培養液(M E M - 10%胎児牛血清)中5% C O ₂ 存在下37℃で培養し調製した。この接着細胞培養用容器から培養液を除いた後、0.25%のトリプシンを添加して処理することにより接着細胞を接着細胞培養用容器から剥離し、細胞数を測定した。細胞用遠心機で1000回転3分間、遠心することにより上清を除去し、H e L a 細胞を回収した。遠心後の細胞の沈殿物に核酸可溶化試薬Aを 5×10^5 個あたり $350 \mu\text{l}$ 添加した。1分間激しくボルテックスミキサーにより攪拌して細胞を溶解した。70%エタノールを $350 \mu\text{l}$ 添加後約5秒間ボルテックスミキサーにより攪拌し、核酸混合物溶液を得た。得られた核酸混合物溶液を実施例1の(5)と同様にして、R N A 分離精製操作を行った。尚、D N a s e 溶液の量は $10 \mu\text{l}$ でR N A 分離精製操作を行った。

【0141】

〔比較例4〕

実施例2の核酸混合物溶液を市販の精製キットR N e a s y m i n i k i t (Q I A

GEN社製)を使用して、同キットのプロトコルに従いRNA分離精製操作を行った。尚、DNase溶液の量は80 μ lでRNA分離精製操作を行った。

【比較例5】

実施例3の核酸混合物溶液を比較例4と同様にしてRNA分離精製操作を行った。

【0142】

実施例2および実施例3並びに実施例4および実施例5で回収された核酸を含む回収液のRNA回収量を各々測定した。測定法は260nmの吸光度を使用する方法を用いた。結果を表1に示す。

【0143】

【表1】

【表1】

	実施例		比較例	
	No.	RNA回収量(μ g)	No.	RNA回収量(μ g)
on-dish法(1.5×10^6 個)	実施例2	28.9	比較例4	24.2
剥離法(5×10^5 個)	実施例3	13.5	比較例5	11.9

【0144】

次に実施例3および比較例5で回収された核酸を含む回収液をMOPS-formamide電気泳動法により電気泳動した。結果を図4に示す。

【0145】

図4において実施例3で回収された核酸を電気泳動して得られたバンド1は、市販の精製キットを使用した比較例5のバンド2に比べて、純度が同等の、分解のない高品質のRNAが得られた。

【0146】

さらに表2から、本発明のRNAの選択的分離精製方法を使用した本実施例は、市販の精製キットを使用した比較例に比べ、得られたRNAは、同等の品質で有りながら、回収量が多いことが分かった。

【0147】

【実施例4】

(7)核酸可溶化試薬B(B1およびB2)、洗浄液B並びに回収液Bの調製

下記に示す処方 of 核酸可溶化試薬、洗浄液及び回収液を調製した。

【0148】

(核酸可溶化試薬B1)

グアニジンチオアン酸塩(和光純薬社製)

3.5mol/L

BisTris(同仁化学社製)

0.25mol/L

塩酸を用いて、pH6.5に調製

【0149】

(核酸可溶化試薬B2)

Tween20(和光純薬社製)

15質量%

BisTris(同仁化学社製)

0.1mol/L

塩酸を用いて、pH6.0に調製

【0150】

(洗浄液B)

Tris-HCl(pH7.5)

10mmol/L

塩化ナトリウム

0.5mol/L

エタノール

10容量%

【0151】

(回収液B)

Tris-HCl (pH 6.5)

1 mmol/L

【0152】

(8) 核酸混合物溶液調製

液体窒素で急速凍結したマウス肝臓をハサミで小破片とし、5mgを1.5mlチューブにはかりとった。核酸可溶化試薬B1を350 μ l加え、Rotor-Statorホモジナイザー (Polytron、KINEMATICA社製) にて均一になるまでホモジナイズした。8000 \times gにて3分間、室温にて遠心分離し、組織破片を取らないように新しい1.5mlチューブに上清を移した。ここに核酸可溶化試薬B2を175 μ l加え、ボルテックスミキサーで15秒間攪拌した。さらに、99.5%以上特級エタノールを175 μ l加え、ボルテックスミキサーで1分間攪拌した。

【0153】

(9) RNA分離精製操作

上記(8)の核酸混合物溶液を、上記(1)及び(2)で作成した核酸吸着性多孔性膜を有する核酸精製カートリッジの一の開口に注入し、続いて上記一の開口に圧力差発生装置(シリンジポンプ)を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態(120kPa)にし、注入した核酸混合物溶液を、核酸吸着性多孔性膜に通過させることで、核酸吸着性多孔性膜に接触させ、核酸分離精製カートリッジの他の開口より排出した。続いて、圧力差発生装置を外し、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に洗浄液Bを750 μ l注入し、上記一の開口に圧力差発生装置(シリンジポンプ)を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態(120kPa)にし、注入した洗浄液Bを核酸吸着性多孔性膜に通過させ、他の開口より排出した(洗浄工程1)。圧力差発生装置を外し、DNase溶液(Promega社製RQ1 RNase-Free DNase 500K unit/mLを使用)を膜上に10 μ l(26 μ l/cm²)アブライシ、室温で5分放置した。続いて、先と同様の洗浄を2回行った(洗浄工程2)。その後、圧力差発生装置を外し、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に回収液Bを100 μ l注入し、核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に圧力差発生装置(シリンジポンプ)を結合して核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態(120kPa)にし、注入した回収液Bを核酸吸着性多孔性膜に通過させ、他の開口より排出し、この液を回収した。

【0154】

【比較例6】

上記(8)と同じマウス由来の肝臓を用いて、QIAGEN社製RNeasy Mini Kitを用いて同キットのプロトコルに従い、RNA抽出を行った。DNase溶液はプロトコル通りの80 μ l(208 μ l/cm²)で実施した。

【0155】

実施例4および比較例6で回収された核酸を含む回収液のRNA回収量を各々測定した。測定法は260nmの吸光度を使用する方法を用いた。結果を表2に示す。

【0156】

【表2】

【表2】

	RNA回収量(μ g)
実施例4	21.6
比較例6	18.8

【0157】

実施例4及び比較例6で回収された核酸を含む回収液を1%アガロース電気泳動法により電気泳動した。結果を図5に示す。

【0158】

図5の電気泳動結果より、比較例6バンド4ではDNase溶液を $80\mu\text{l}$ ($208\mu\text{l}/\text{cm}^2$) 必要とするが、実施例4バンド3では $10\mu\text{l}$ ($26\mu\text{l}/\text{cm}^2$) でもDNAが分解された。実施例4では比較例6と比べて少ないDNase溶液量で純度が同等の、分解のない高品質のRNAが得られた。

【0159】

さらに表2から、本発明のRNAの選択的分離精製方法を使用した本実施例は、市販の精製キットを使用した比較例に比べ、得られたRNAは、同等の品質で有りながら、回収量が多いことが分かった。

【0160】

以上のことから、検体が動物組織の場合でも、少量のDNase溶液でDNAとRNAを含む核酸混合物溶液中のDNAを分解し、RNAを選択的に回収できることが確認できた。

【0161】

【実施例5】

(10) 核酸混合物溶液調製

液体窒素で急速凍結したマウス脾臓をハサミで小破片とし、 10mg を 2ml セーフロックチューブ(エッペンドルフ社製)にはかりとった。核酸可溶化試薬B1を $350\mu\text{l}$ 加え、さらに 5mm 径ジルコニアボールを入れた。Tissue Lyzer(QIAGEN社製)の設定を 20Hz として、3分間に2回ホモジナイズする。 $8000\times g$ にて3分間、室温にて遠心分離し、組織破片を取らないように新しい 1.5ml チューブに上清を移した。ここに核酸可溶化試薬B2を $175\mu\text{l}$ 加え、ボルテックスミキサーで15秒間攪拌した。さらに、 99.5% 以上特級エタノールを $175\mu\text{l}$ 加え、ボルテックスミキサーで1分間攪拌した。

【0162】

(11) RNA分離精製操作

上記(9)と同様にRNAを回収した。DNase処理についても同様にPromega社製RQ1 RNase-Free DNase 500Kunitz U/mL を膜上に $10\mu\text{l}$ ($26\mu\text{l}/\text{cm}^2$) アプライして行った。

【0163】

【比較例7】

上記(10)と同じマウス由来の脾臓を用い、同じホモジナイズ方法にて、QIAGEN社製RNeasy Mini Kitを用いて同キットのプロトコルに従い、RNA抽出を行った。DNase溶液はプロトコル通りの $80\mu\text{l}$ ($208\mu\text{l}/\text{cm}^2$) で実施した。

【0164】

実施例5及び比較例7で回収された核酸を含む回収液を 1% アガロース電気泳動法により電気泳動した。結果を図6に示す。

【0165】

図6の電気泳動結果より、比較例7バンド6ではDNase溶液を $80\mu\text{l}$ ($208\mu\text{l}/\text{cm}^2$) でもかすかにゲノムDNAバンドが認められるのに対し、実施例5バンド5では $10\mu\text{l}$ ($26\mu\text{l}/\text{cm}^2$) でもDNAが分解された。実施例5では比較例7と比べて少ないDNase溶液量で純度がより良好なRNAを回収できた。

【0166】

【実施例6】

(12) 核酸混合物溶液調製

液体窒素で急速凍結したマウス肝臓をハサミで小破片とし、 5mg を 1.5ml チューブにはかりとった。核酸可溶化試薬B1を $350\mu\text{l}$ を加え、PELLET PESTLES(Kimble/Kontes社製)を専用モーターに取り付け、均一になるまでホモジナイズした。 $8000\times g$ にて3分間、室温にて遠心分離し、組織破片を取らないよ

うに新しい1.5mlチューブに上清を移した。ここに核酸可溶化試薬B2を175 μ l加え、ボルテックスミキサーで15秒間攪拌した。さらに、99.5%以上特級エタノールを175 μ l加え、ボルテックスミキサーで1分間攪拌した。

【0167】

(13) RNA分離精製操作

上記(9)と同様にRNAを回収した。DNase処理についても同様にPromega社製RQ1 RNase-free DNase 500Kunitz U/mLを膜上に10 μ l(26 μ l/cm²)アプライした。

【0168】

【比較例8】

上記(12)と同じマウス由来の肝臓を用い、同じホモジナイズ方法にて、QIAGEN社製RNeasy Mini Kitを用いて同キットのプロトコルに従い、RNA抽出を行った。DNase溶液はプロトコル通りの80 μ l(208 μ l/cm²)で実施した。

【0169】

実施例6及び比較例8で回収された核酸を含む回収液を1%アガロース電気泳動法により電気泳動した。結果を図6に示す。

【0170】

図6の電気泳動結果より、比較例8バンド8ではDNase溶液を80 μ l(208 μ l/cm²)必要とするが、実施例6バンド7では10 μ l(26 μ l/cm²)でもDNAが分解された。実施例6では比較例8と比べて少ないDNase溶液量で純度が同等の、分解のない高品質のRNAが得られた。

【図面の簡単な説明】

【0171】

【図1】実施例1及び比較例1、2、3において回収された核酸を含む回収液を、1%アガロースゲルを用いて電気泳動して得られた写真である。

【図2】比較例2において回収された核酸を含む回収液を、1%アガロースゲルを用いて電気泳動して得られた写真である。

【図3】実施例1及び比較例1において回収された核酸を含む回収液を、1%アガロースゲルを用いて電気泳動して得られた写真である。

【図4】実施例3および比較例5において回収された核酸を含む回収液を、MOPSF-formamide電気泳動法により電気泳動して得られた写真である。

【図5】実施例4および比較例6において回収された核酸を含む回収液を、1%アガロースゲルを用いて電気泳動して得られた写真である。

【図6】実施例5および比較例7、実施例6および比較例8において回収された核酸を含む回収液を、1%アガロースゲルを用いて電気泳動して得られた写真である。

【符号の説明】

【0172】

R	RNA由来のバンド	
D	DNA由来のバンド	
E10	実施例1	DNase液量10 μ l(26 μ l/cm ²)
E20	実施例1	DNase液量20 μ l(52 μ l/cm ²)
E40	実施例1	DNase液量40 μ l(104 μ l/cm ²)
E80	参考例	DNase液量80 μ l(208 μ l/cm ²)
C1	比較例1	DNase液量0 μ l
C2-10	比較例2	DNase液量10 μ l(26 μ l/cm ²)
C2-20	比較例2	DNase液量20 μ l(52 μ l/cm ²)
C2-80	比較例2	DNase液量80 μ l(208 μ l/cm ²)
C3	比較例3	DNase液量0 μ l

【0173】

M RNA 分子量マーカー

1 実施例 3

2 比較例 5

【0174】

3 実施例 4 DNase 液量 $10\ \mu\text{l}$ ($26\ \mu\text{l}/\text{cm}^2$)

4 比較例 6 DNase 液量 $80\ \mu\text{l}$ ($208\ \mu\text{l}/\text{cm}^2$)

M2 1 kb PLUS Ladder

【0175】

5 実施例 5 マウス脾臓 DNase 液量 $10\ \mu\text{l}$ ($26\ \mu\text{l}/\text{cm}^2$)

6 比較例 7 マウス脾臓 DNase 液量 $80\ \mu\text{l}$ ($208\ \mu\text{l}/\text{cm}^2$)

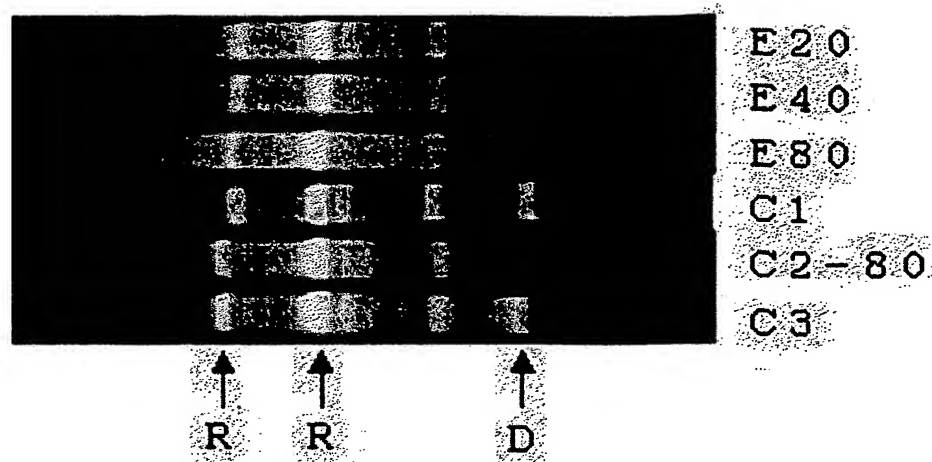
7 実施例 6 マウス肝臓 DNase 液量 $10\ \mu\text{l}$ ($26\ \mu\text{l}/\text{cm}^2$)

8 比較例 8 マウス肝臓 DNase 液量 $80\ \mu\text{l}$ ($208\ \mu\text{l}/\text{cm}^2$)

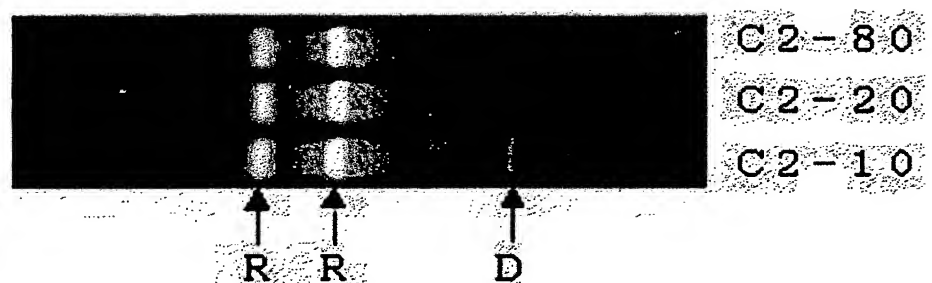
M3 1 kb PLUS Ladder

【書類名】 図面

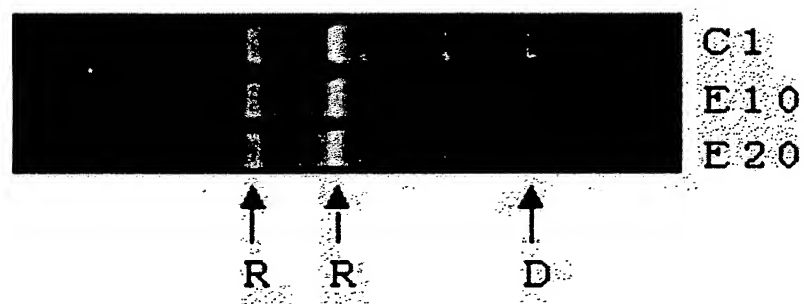
【図 1】



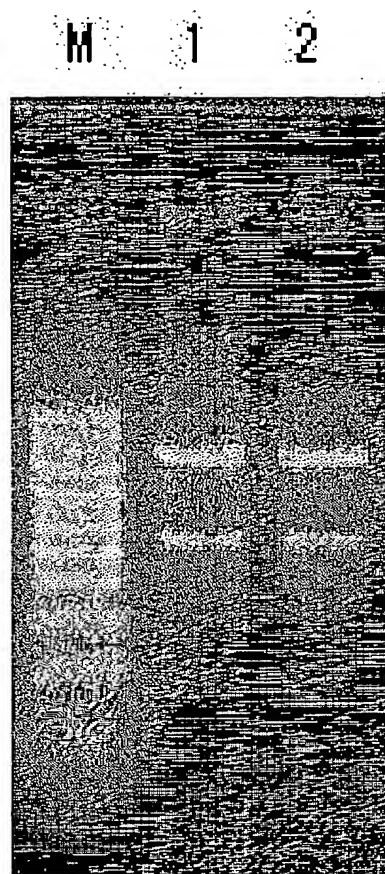
【図 2】



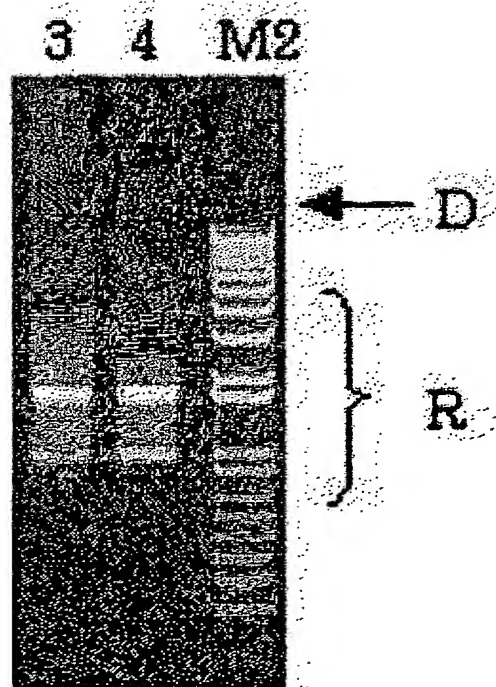
【図 3】



【 図 4 】



【 図 5 】



【図 6】

